

博士論文（要約）

ナノ粒子の運動解析に基づく
ホモジニアスデジタルイムノアッセイによる
バイオマーカー測定に関する研究

赤間 健司

第1章. 序論

高感度なタンパク質の計測技術は、生命現象の解明や創薬などのライフサイエンス領域の研究の推進や、先制医療・個別化医療などの新たな医療の実現において、重要な基盤技術となる。従来、試料中のタンパク質バイオマーカーの分析には、酵素による信号増幅を利用した酵素結合免疫吸着法（Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay、ELISA）が標準法として用いられており、その検出下限は nM から pM であった。一方、1 分子計測技術を応用した Digital ELISA は世界で最も高感度且つロバストな分析技術の一つとして知られており、従来の ELISA と比較して 1000 倍以上の高感度化を実現した。しかし、複数の試薬を添加する工程と試料中の夾雑物質や添加試薬中の未結合の物質を除去するための洗浄工程とを繰り返し実施する必要があり、多数の工程は分析の長時間化やばらつきが増大、さらには自動化や小型化の困難化を引き起こす可能性がある。また、信号増幅に必須の酵素は、同品質での安定供給や長期の安定保存が難しく、品質管理に課題がある。そこで本論文では、ナノ粒子の運動に着目し、複数回の試薬の添加・洗浄工程、及び酵素による信号増幅工程を含まない新たなデジタル計測技術を提案した。一般に、B/F 分離（抗体により捕捉された抗原の画分（Bound 画分）と抗体に捕捉されずに遊離している抗原の画分（Free 画分）とを分離し、Free 画分を洗浄等により除去する工程）を必要としないタンパク質の分析法をホモジニアスイムノアッセイと呼ぶ。つまり、本論文ではホモジニアスデジタルイムノアッセイの構築に取り組み、同分析技術によるバイオマーカーの測定を検討した。具体的には、ホモジニアスデジタルイムノアッセイのための分析場の構築（2 章）、同分析場を用いたバイオマーカー測定の実証（3 章）、同分析法の多項目バイオマーカーの同時測定への展開（4 章）に取り組んだ。

第2章. ホモジニアスデジタルイムノアッセイのための分析場の構築

(i) ナノ粒子の運動解析に基づくターゲット特異信号と非特異信号の判別、(ii) 反応空間制御による抗原抗体反応の高効率化、(iii) 磁場によるナノ粒子の微小反応場への高効率な封入、の三点を特徴とする Digital HoNon-ELISA (Digital Homogeneous Non-enzymatic ELISA) を提案した。具体的なアッセイプロトコルを図 1 に示す。まず、抗体を修飾したナノ磁性粒子（直径 550 nm）を用いてターゲットタンパク質を捕捉する。このとき、統計的に粒子上のターゲット数が 0 もしくは 1 となるようにターゲット数に対して過剰量の粒子を用いる。続いてフ

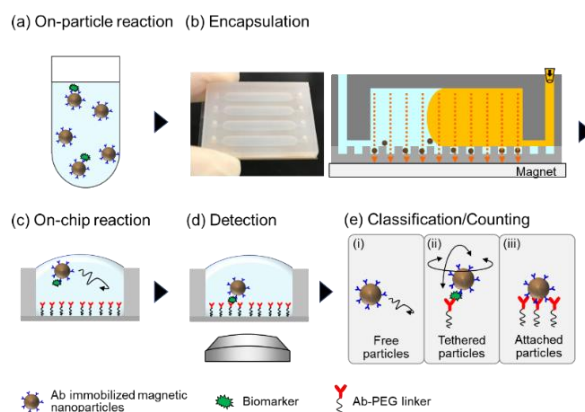


図 1 Digital Ho-Non ELISA のプロトコル

ェムトリットルサイズの微小反応容器を多数備えた fL Reactor Array Device (FRAD) にビーズ溶液を添加し、磁力でリアクター内に粒子を集めた後に、オイルで封止して微小反応場を形成する。リアクター表面にはポリエチレングリコール (PEG) リンカーを介して抗体が修飾されており、粒子上のターゲットと抗原抗体反応を行う。次に、顕微鏡で粒子のブラウン運動を観察し、その動きから自由拡散粒子、制限運動を示す粒子、リアクター表面に非特異吸着した静止粒子に分類する。最後に、制限運動を示す粒子をターゲット特異的な信号としてデジタルカウントすることでサンプルの濃度を計算する。

ナノ粒子の運動解析に基づくターゲット特異信号と非特異信号の判別

図 1 に示すプロトコルにより、Prostate-Specific Antigen (PSA) と反応させた粒子及び未反応の粒子を高速カメラと暗視野顕微鏡を用いて 5000 fps で 1 秒間観察した。粒子の軌跡から拡散係数 (D) を計算した結果、PSA と未反応の粒子では 2 つのピークが確認され (図 2(a))、PSA と反応した粒子では 3 つのピークが確認された (図 2(b))。ピーク 1-3 はそれぞれ非特異吸着粒子、制限運動粒子、及び自由拡散粒子であり、PSA 依存的に検出されたピーク 2 がターゲット特異的な信号と考えられる。本結果より、B/F 分離のないプロトコルにおいて、ナノ粒子の運動からターゲット特異的な信号を検出できることが実証された。

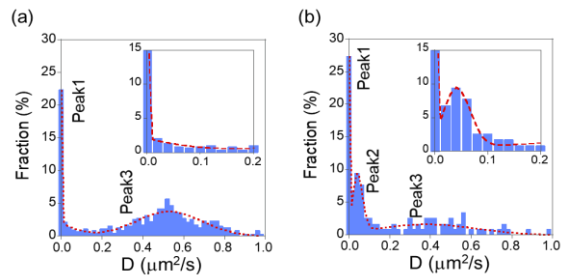


図 2 抗原抗体反応後のナノ粒子の運動の分布 (a)PSA = 0 fM, (b)PSA = 580 fM

fL リアクターを用いた反応空間制御による抗原抗体反応の高効率化

ナノ粒子は一分子計測技術における有用な標識として古くから用いられており、基板上にナノ粒子を固定化したバイオセンサーも報告されている。しかし拡散律速によって抗原抗体反応の効率が低く、高感度検出は実現できていない。本検討では、抗原抗体反応の効率を改善するために、ターゲットを捕捉した粒子をリアクター内に封入した。粒子はリアクター内でブラウン運動を示すため、衝突確率が向上し、反応効率の改善が期待される。図 1 に示すプロトコルで体積が約 5 fL の微小反応場を形成し、反応場形成後のシグナル (ピーク 2 の割合) の時間変化を測定した (図 3)。PSA 陽性サンプル測定時の時定数は約 13.5 秒となり、理論計算 (時定数約 8.3 秒) から推定されるように微小空間内で迅速な抗原抗体反応が可能であることが示された。

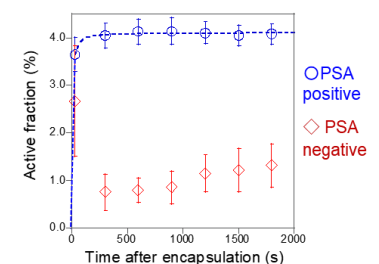


図 3 fL リアクター内での抗原抗体反応の時間変化

fL リアクターへの磁性粒子の高効率な封入

従来のデジタルイムノアッセイでは、微小反応場への粒子やターゲットの封入には自由拡散を利用した手法が多く用いられてきた。しかし、同手法は封入効率が低く高感度測定のためには封入効率の改善が課題だった。本検討では、磁力を用いることで高い封入効率を実現した。流路直下のリアクター数を 550 万個とし、100 万個の粒子を用いて図 1 のアッセイを行った。

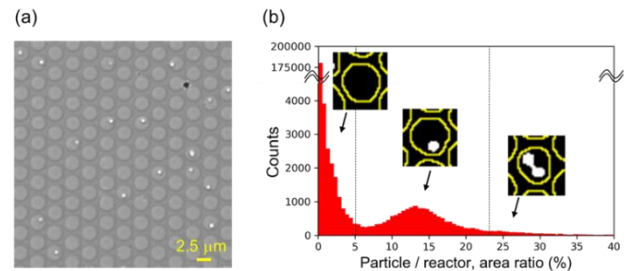


図 4 fL リアクターへの磁性粒子の封入 (a)代表画像, (b)リアクターに対する粒子の面積比

流路内に粒子溶液を添加し均一に攪拌した後、流路全体に対して垂直方向の均一磁界を発生させた。取得した明視野像 (図 4(a)) から粒子及びリアクターを抽出し、リアクターに対するリアクター内部の粒子の面積比を算出した (図 4(b))。図 4(b) に示す一つ目のピークが粒子なしのリアクター、二つ目のピークが粒子 1 個を捕捉したリアクター、また二つ目のピークの裾部分が 2 個以上の粒子を含むリアクターであった。ガウシアンフィッティングにより各々のピークを算出した結果、添加した全粒子に対する捕捉された粒子の割合は、約 $25.6 \pm 8.3\%$ となった。この値は自由拡散でリアクターに捕捉される粒子の割合の理論値 (0.045%) と比較して約 570 倍である。つまり、磁場を用いた封入によって、従来の自由拡散で捕捉する場合と比較して高効率な封入を実現できたことが示された。

第3章. ホモジニアスデジタルイムノアッセイによるバイオマーカーの定量

本章では、第2章で構築した Digital Ho-Non ELISA をバイオマーカーの定量に応用するための技術開発を行い、その定量性能を評価した。具体的には、スループットの改善と血清サンプル測定への対応に取り組んだ。まず、定量に必要な粒子数を実効的なスループットで撮影するために、フレームレートの抑制、及び暗視野観察から明視野観察への変更による視野サイズの拡大を検討した。その結果、50 fps で視野サイズ $333 \times 333 \mu\text{m}^2$ のとき、Digital ELISA 相当の粒子数 (3.0×10^4 以上) の運動を1分以内で検出可能な系を構築した。次に、血清サンプル測定のためにナノ粒子溶液のバッファーを検討した。脂質系界面活性材 (BL206, NOF) を 0.05 % 含む BSA/カゼイン含有溶液 (HISCL R3 buffer, Sysmex) を用いて希釈倍率が 9 倍となるようにバッファー体積を設定することで、臨床用全自動 ELISA 装置 HISCL (Sysmex) と同程度の添加回収率を実現した。続いて、検出下限評価を行った結果、PSA を添加した PBS バッファーをサンプルとした測定 (純系) では 0.093 pg/mL となり、Digital ELISA (0.054 pg/mL) に匹敵する検出下限の実現可能性を示した (図 5)。一方、人血清に添加した PSA の測定では 0.56 pg/mL となり、純系と比較して検出下限の上昇を確認し、夾雑物質の影響のさらなる抑制が必要であることが明らかとなった。また、さらなる高感度化に向けて次の四つの課題を抽出した；①特異シグナル向上のための fL リアクター内の抗原抗体反応の改善、②FRAD の品質改善、③ナノ粒子の運動分類における各ピークの明確な分離、④非特異吸着抑制。これらの課題の解決によって、Digital ELISA を超える高感度検出を実現できる可能性がある。

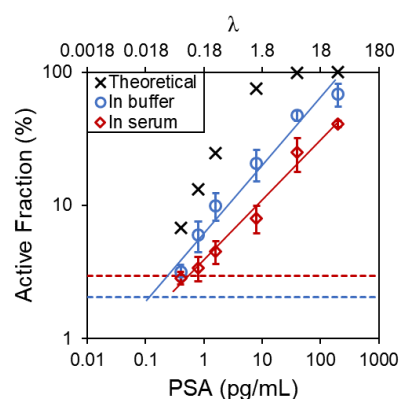


図 5 PSA の検量線
点線はブランクの平均値+3SD, λ は
粒子上の平均ターゲット数

第4章. バイオマーカーの多項目同時測定への展開

本章では、前章までに構築した Digital Ho-Non ELISA を用いて、バイオマーカーの多項目同時計測の原理検証を行った。蛍光粒子の波長によって項目を判別する手法を Digital Ho-Non ELISA に適用し、図 1 に示すプロトコルに次の三点の変更を加え、図 6 に示すプロトコルを提案した；(i) 蛍光磁性ナノ粒子の使用、(ii) fL リアクター内部の複数抗体修飾、(iii) 明視野撮影から蛍光観察への変更。同手法により、PSA 及び IL6 をモデルターゲットとした二項目同時検出を検討した。

まず、fL リアクター内部のみを抗 PSA 抗体及び抗 IL6 抗体で修飾可能であり、その比率を制御可能であることを示した。次に、蛍光磁性ナノ粒子を用いた蛍光観察への変更を評価した結果、光学的なクロストークの影響なく、従来の明視野撮影と同程度の位置決定精度によって各々の粒子を検出可能であることが分かった。続いて、PSA 及び IL6 の同時測定を実施した結果、それぞれの項目で濃度依存的な信号を確認でき、検出下限は各々の単項目測定と同程度となった (図 7)。このことから、Multiplexed Digital Ho-Non ELISA が

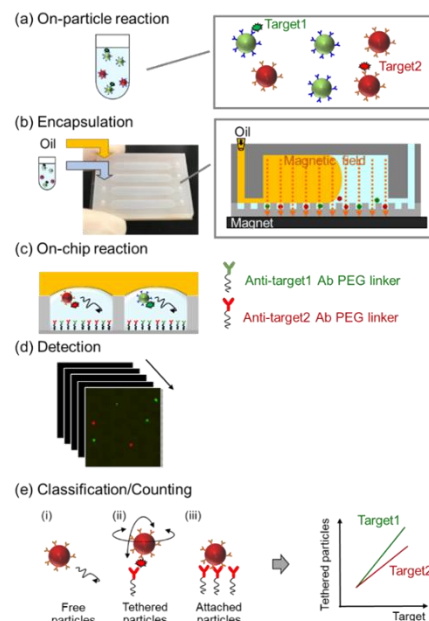


図 6 Multiplexed Digital Ho-Non ELISA のプロトコル

それぞれのターゲットを特異的且つ同時に検出可能であることが示された。最後に、Multiplexed Digital Ho-Non ELISA の課題抽出を行った。主な課題は次の四点である；①非特異吸着の抑制とさらなる位置決定精度の向上のための粒子の最適化、②光学系の簡易化、③抗原抗体の交差反応の抑制、④撮影の短時間化。尚、ホモジニアスデジタルイムノアッセイを用いた多項目同時計測は未だ報告されておらず、本研究が初めての報告となる。

第5章. 総括

本章ではこれまでの研究をまとめ、研究の目的を達成したこと、及び今後の展望を述べた。本論文が提案した Digital Ho-Non ELISA は、デジタルイムノアッセイの高感度性を簡易なプロトコルで実現可能であるため、学術領域だけでなく産業領域に対しても大きな貢献が可能な分析ツールになると考えられる。

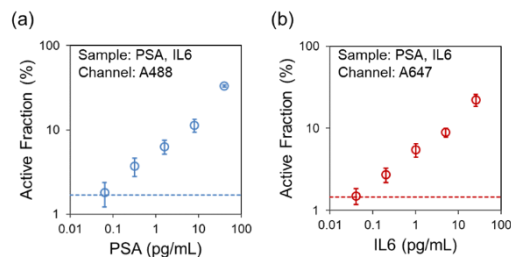


図 7 PSA, IL6 の同時計測
点線はブランクの平均値+3SD